

09/889611

PCT/JP00/00350

日本特許庁

4 PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

25.01.00

REC'D 10 MAR 2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 1月25日

JP00/350

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第015667号

出願人  
Applicant(s):

宮田 敏男  
黒川 清

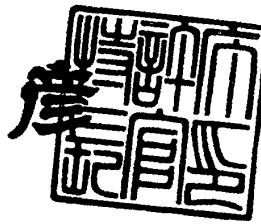
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆



出証番号 出証特2000-3009562

【書類名】 特許願

【整理番号】 F2-003

【提出日】 平成11年 1月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101

【氏名】 宮田 敏男

【特許出願人】

【識別番号】 597142376

【氏名又は名称】 宮田 敏男

【特許出願人】

【識別番号】 597142387

【氏名又は名称】 黒川 清

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

特平11-015667

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 メグシンプロモーター

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：1に記載の塩基配列またはその一部を含み、プロモーター活性を有するDNA。

【請求項2】 請求項1に記載のDNAを含むベクター。

【請求項3】 請求項1に記載のDNAの下流に異種遺伝子が発現可能な状態で結合している、請求項2に記載のベクター。

【請求項4】 請求項3に記載のベクターが導入された細胞。

【請求項5】 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその一部に結合するタンパク質のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料を配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその一部に接触させる工程、および

(b) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその一部に結合する活性を有するタンパク質を選択する工程、を含む方法。

【請求項6】 請求項5に記載の方法によって単離されるタンパク質。

【請求項7】 転写因子である、請求項6に記載のタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、腎細胞で発現する遺伝子のプロモーターに関する。本発明のプロモーターは、遺伝子治療などの分野に応用が可能である。

【0002】

【従来の技術】

体内の60兆個もの様々な細胞が、本質的に同一のゲノムDNAを有している。正常な生理学的機能のために、これらの遺伝子の発現は、細胞系統、および細胞が受容するシグナルにより厳密に制御されている。従って、個々の細胞型で特異的に発現している遺伝子を解明することは極めて重要である。

【0003】

メサンギウム (mesangium) は、腎糸球体の毛細管係蹄の小葉中心部に位置し、各小葉を結びつける芯となる組織である。メサンギウムは糸球体基底膜に覆われており、毛細管腔とは内皮細胞によって隔てられている細胞 (メサンギウム細胞: mesangial cell) と3層からなる糸球体基底膜の中の内透明層と連続している無形物質 (メサンギウム基質: mesangial matrix) から構成されている。

## 【0004】

メサンギウム細胞は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしていることが知られており、また、糸球体腎炎や糸球体硬化症などの糸球体疾患の発症における主要な要因であると考えられている。そして、メサンギウム細胞は、各種腎炎において障害の標的となっている。例えば、メサンギウム細胞の増殖や細胞外メサンギウム基質の蓄積は、末期腎不全の2大原因である慢性糸球体腎炎および糖尿病性腎症のような種々の糸球体障害を有する患者に糸球体硬化症をもたらす最初の過程とされている [D.Schlondorff, Kidney Int., 49, 1583-1585 (1996); R.B.Sterzel et al., Glomerular mesangial cells. Immunological Renal Diseases, pp595-626 (1997)]。従って、メサンギウム細胞で特異的に発現している遺伝子を見いだし、その発現の調節機構を明らかにすることは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等に有効である。

## 【0005】

ところで、本発明者は、大規模DNA配列決定およびデータベース解析により、メサンギウム細胞で特に強く発現する遺伝子として、MEGSINと命名した遺伝子を単離し、その全塩基配列を決定した。そして、MEGSINの全長cDNAクローンがコードする380個のアミノ酸からなる新規タンパク質 (ヒトMEGSIN) の配列を決定した。さらに、Swiss Protデータベースを用いてFASTAプログラムによるアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、ヒトMEGSINが、SERPIN (セリンプロテアーゼインヒビター) スーパーファミリー [R.Carrell et al., Trends Biochem.Sci., 10, 20 (1985); R.Carrell et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 52, 527 (1987); E.K.O.Kruithof et al., Blood, 86, 4007 (1995); J.Potempa

et al., J.Biol.Chem., 269, 15957 (1994); E.Remold-O'Donnell, FEBS Let., 315, 105 (1993)] に属するタンパク質であることを見出した [T.Miyata et al., J.Clin.Invest., 120, 828-836 (1998)]。

#### 【0006】

ヒトMEGSINは、ヒト纖維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、ケラチノサイトでは発現が弱く、メサンギウム細胞で特に強く発現している(即ち、ヒトMEGSIN遺伝子の発現はメサンギウム細胞に特異性を有する)。また、IgA腎症患者や糖尿病性腎症患者と健常人との腎臓組織中のMEGSINの発現量を比較すると、IgA腎症患者や糖尿病性腎症患者においてMEGSINが有意に発現量が多い。また、ラットを用いたメサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルにおいて、発現量の上昇が認められた。

#### 【0007】

このように、MEGSIN遺伝子の発現は、腎疾患に深く関与している可能性があることから、MEGSIN遺伝子の発現制御機構の実態を明らかにし、ヒトMEGSINの生体内における機能の解明やその変異によって引き起こされる遺伝性疾患などへの診断、治療に有用なプロモーターの提供、あるいは腎メサンギウム細胞に特異的に発現するプロモーターを提供することが望まれていた。

#### 【0008】

一方、ヒトMEGSINが属するSERPINスーパーファミリーは、一次構造上相互に高い相同性を有することから、進化上共通の祖先タンパク質から分岐したと考えられている。すなわち、アミノ酸配列上の変異アミノ酸数 [K.Suzuki et al., Tanpakushitsu Kakusan Koso, 34, 949-962 (1989)] や染色体遺伝子構造に基づいて作製された進化系統樹 [J.J.Bao, et al., Biochem., 26, 7755 (1987)] の解析の結果、SERPINスーパーファミリーは、種々の高等脊椎動物とともに500万年以上にわたって進化してきたことが示されている。しかしながら、MEGSIN遺伝子は、糸球体メサンギウム細胞に特異的に発現するという点で極めて特徴的である。

#### 【0009】

また最近、イオンチャネルや輸送に係わる遺伝子が、腎臓に特異的に発現す

ることが報告されている [S.J.Lolait et al., *Nature*, 357, 336-339 (1992); Y.Kanai et al., *J.Clin.Invest.*, 93, 397-404 (1994); S.Uchida et al., *J.Biol.Chem.*, 268, 3821-3824 (1993); S.Adachi et al., *J.Biol.Chem.*, 269, 17677-17683 (1994); K.Fushimi et al., *Nature*, 361, 549-552 (1993); G.Gamba et al., *J.Biol.Chem.*, 269, 17713-17722 (1994)]。

しかしながら、これらの遺伝子は、尿細管上皮細胞に局在しており、糸球体メサンギウム細胞では発現していない。

従って、MEGSIN遺伝子のプロモーターおよび転写因子を解明することにより、細胞型依存的な遺伝子発現機構に関する重要な情報を得ることができる。さらにこのようにして得られた情報は、分子遺伝学や遺伝子導入における標的細胞にも応用することができる。

#### 【0010】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、MEGSIN遺伝子のプロモーターおよびその利用を提供することを課題とする。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らはMEGSIN遺伝子の発現調節機構を解明するために、MEGSIN遺伝子より上流（5'側）約1.5kbを含むゲノムDNAの塩基配列を決定した。S1ヌクレアーゼプロテクションアッセイの結果、MEGSIN mRNAの転写開始点は4種類存在していることが判明した。転写開始点の上流には、AP1結合部位、cMyb結合部位、およびOct-1を含む転写制御部位となり得る保存された転写制御配列が存在することが判明した。これらの転写制御配列を含む領域をさまざまに欠失させたDNAの3'側にルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターを作製し、細胞にトランスフェクトしてルシフェラーゼ活性による転写制御領域の決定を行ったところ、転写を正に制御する2つの制御配列を同定した。それらのうち3'側に位置するプロモーター領域について、部位特異的変異導入法により塩基置換を行い、その転写制御活性につき詳細な解析を行った。その結果、本発明者らは、転写制御に重要な役割を担うDNAの塩基配列を特定することに成功した。

## 【0012】

従って、本発明は、MEGSIN遺伝子のプロモーターおよびその利用に関し、より具体的には、

- (1) 配列番号：1に記載の塩基配列またはその一部を含み、プロモーター活性を有するDNA、
- (2) (1)に記載のDNAを含むベクター、
- (3) (1)に記載のDNAの下流に異種遺伝子が発現可能な状態で結合している、(2)に記載のベクター、
- (4) (3)に記載のベクターが導入された細胞、
- (5) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその一部に結合するタンパク質のスクリーニング方法であって、
  - (a) 被検試料を配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその一部に接触させる工程、および
  - (b) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその一部に結合する活性を有するタンパク質を選択する工程、を含む方法、
- (6) (5)に記載の方法によって単離されうるタンパク質、
- (7) 転写因子である、(6)に記載のタンパク質、

に関する。

## 【0013】

なお、本明細書において、「プロモーター」とは転写開始部位の近傍に存在し、遺伝子の発現を制御するDNA領域を指す。また、「プロモーター活性」とは、その下流に存在する遺伝子の発現を制御するプロモーターの活性を指す。

## 【0014】

## 【発明の実施の形態】

本発明は、MEGSIN遺伝子のプロモーターを提供する。実施例3に示すように、MEGSIN遺伝子の5'上流域において、-128位より下流の塩基の欠失や置換の多くがそのプロモーター活性の著しい低下を示した。従って、本発明のプロモーターは、-128位より下流のMEGSIN遺伝子の5'上流域（配列番号：1）の少なくとも一部を含む。

## 【0015】

本発明のプロモーターとしては、-128位より下流の領域（配列番号：1）の少なくとも一部を含み、かつ、プロモーター活性を有する限り、配列番号：1に示す塩基配列において塩基が置換された配列を有していてもよい。しかしながら、図7に示すように、-128位より下流の領域における、m1変異（-128位および-127位の塩基の置換）、m2変異（-120位、-118位、および-117位の塩基の置換）、m3変異（-116位および-115位の塩基の置換）、m4変異（-113位および-112位の塩基の置換）、m5変異（-106位および-105位の塩基の置換）、m6変異（-100位および-98位の塩基の置換）、およびm7変異（-94位および-93位の塩基の置換）はそのプロモーター活性の低下を招いた。

従って、本発明のプロモーターとしては、高いプロモーター活性を必要とする場合、これらの塩基が置換されていることは好ましくない。

## 【0016】

本発明のプロモーターは、例えば、ゲノムDNAライブラリーのスクリーニングによって単離することができる。即ち、既に判明しているMEGSIN cDNAまたはその一部をプローブとしてヒトや他の動物のゲノムDNAライブラリーをハイブリダイゼーションスクリーニングすることにより、また、MEGSIN cDNA配列またはMEGSINゲノムDNA配列の情報を基に作成したプライマーを利用してヒトや他の動物のゲノムDNAライブラリーを鑄型にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行うことにより単離することができる。

## 【0017】

また、本発明のプロモーターは、例えばホスホアミダイト法 [Mattencci, M.D. & Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc. 103, 3185(1981)]、ホスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M. et al. Nature 310, 105 (1984)] 等の核酸の化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

## 【0018】

DNA断片中に存在するMEGSIN遺伝子のプロモーター領域およびエンハンサー領域（イントロンまたは3' 非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域）は、例えば、特開平6-181767号公報や文献 (The Journal of Immunology(1995

)155,2477-2486, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995), 92,3561-3565) と同様の方法で取得することが可能である。

【0019】

一般的には、発光反応や呈色反応などにより定量が容易に行えるタンパク質をコードする遺伝子（レポーター遺伝子）をプロモーター候補領域の下流に発現可能な状態で結合し、これを宿主細胞に導入して呈色反応や発光を検出することにより、プロモーター活性の有無やプロモーター活性の強弱を判定することができる。

【0020】

具体的には、プロモーター領域は、これに制限されないが、以下の方法によって取得することができる。

- 1) 上記のようにゲノムDNAまたはゲノムライブラリーより転写制御領域を含むDNAをクローニングする。
- 2) 制限酵素消化してMEGSIN遺伝子の翻訳開始コドンを含むその上流部分のプロモーター領域を含むDNA (2~5 kbp) を得て、塩基配列を決定する。メサンギウム細胞等から調製したpoly(A)<sup>+</sup> RNAを錆型とし、MEGSIN遺伝子の5'末端側cDNA配列より選択したプライマーDNAを用いたプライマー伸長法により、転写開始点 (+1) を決定する。塩基配列から転写因子結合配列を検索し、プロモーター活性を有する可能性がある箇所を予想する。
- 3) 2) で得たDNAからMEGSIN遺伝子のコード領域を除いたDNA断片をプラスミド上にサブクローニングし、この 2~5 kbp DNA断片の下流に、レポーター遺伝子（例えば、クロラムフェニコールアセチル転位酵素（C A T）遺伝子、あるいはルシフェラーゼ遺伝子など）を連結したレポータープラスミドを構築する。同様に、プロモーター領域の可能性がある各箇所を含むような形で、制限酵素消化により、あるいはPCR等により、5'末端側及び3'末端側を順次削ったMEGSIN遺伝子上流部分の様々な部位に該当するDNA断片を作成し、これらの下流に、レポーター遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。また、部位特異的変異導入法により適宜、1つまたは複数の塩基の置換、欠失、付加および／または挿入を行い変異を導入したDNA断片を作成し、これらの下流にレポーター遺伝子を

連結したレポータープラスミドを構築する。

4) 3) で作製したレポータープラスミドで形質転換した動物細胞のレポーター活性（例えば、CAT活性あるいはルシフェラーゼ活性等）を測定することにより、MEGSIN遺伝子上流部分に存在するプロモーター領域を同定する。

#### 【0021】

また、3' 非コード領域やインtron中におけるエンハンサー領域は、例えば、MEGSIN cDNA等をプローブとしたゲノムライブラリーのスクリーニングにより、まずMEGSINのゲノム遺伝子をクローニングし、次いで、上述のプロモーターに関する方法と同様の実験を行うことにより同定することができる。

#### 【0022】

本発明のプロモーターは、その下流に結合した遺伝子を腎臓（メサンギウム細胞）で高率に発現させる活性を有する。このため本発明のプロモーターは、例えば、腎臓で所望の遺伝子の発現を任意に制御できるベクターの開発に利用できる。また、本発明のプロモーターを活性化する転写因子を有する他の細胞（臓器）においても同様の効果が期待できる。このような腎臓特異的に活性化するプロモーターは、例えば、腎臓疾患の遺伝子治療のためのベクター作製に用いることができる。

#### 【0023】

本発明のプロモーターを腎臓特異的な遺伝子の発現に利用する場合には、本発明のプロモーターの下流に腎臓において発現させたい所望の遺伝子を発現可能な状態で結合し、これを標的細胞に導入する。ここで「発現可能な状態で結合する」とは、遺伝子の転写が可能となるように、本発明のプロモーターと該遺伝子とが結合していることを指す。

#### 【0024】

標的細胞に導入する場合、本発明のプロモーターおよび該プロモーターにより制御される遺伝子は、適当なベクターに導入されていてもよい。また、本発明のプロモーターは、単独で用いても、エンハンサー、サイレンサー等の転写制御配列を組み合わせて用いてもよい。

#### 【0025】

遺伝子治療を目的とする場合、用いられるベクターとしては、例えば、レトロウイルス、単純性ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン-バーウイルス、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、シンドビスウイルス、ポックスウイルスなどに由来するベクターが挙げられる。また、温度感受性リポソーム、血中安定性リポソーム、カチオニックリポソーム、pH感受性リポソームおよびウイルスのエンベロープタンパク質を組み込んだ再構成リポソームなどのリポソーム製剤、HVJ（センダイウイルス）-リポソーム [T.Nakagawa et al., Drug Delivery System, 11, 411 (1996)]、VSV（水疱性口内炎ウイルス）-リポソーム（特願平9-357506号）などのウイルスの膜融合能を付与した膜融合リポソーム製剤などを用いることもできる。

## 【0026】

これらのベクターを導入する対象となる細胞としては、例えば、メサンギウム細胞、尿細管細胞、マクロファージ、リンパ球、内皮細胞、腫瘍細胞などが挙げられる。

## 【0027】

なお、上述した他、本発明のプロモーター、該プロモーターを含有する組換えベクター、該ベクターの細胞への導入などの一般的な遺伝子操作は、例えば、「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」 (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.) に記載の常法に従って行うことができる。

## 【0028】

また、本発明のプロモーターの変異は、重篤な遺伝疾患を引き起こすと考えられることから、該プロモーターは、遺伝子診断への応用も期待できる。この遺伝子診断は、例えば単鎖高次構造多型分析、DNAフィンガープリント法、PCR法を用いたダイレクトシークエンス、遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いた変異解析法などの手法を用いて遺伝子の変異を検出することにより達成される。

## 【0029】

また一方、ヒトMEGSINはSERPINスーパーファミリーに属するタンパク質であることから、ヒトMEGSINの異常症は、血液凝固能の亢進による血栓塞栓症または線

溶能の亢進による出血症をきたすおそれもある（鈴木ら、蛋白質・核酸・酵素、34巻、949-962（1989））。このことは、本発明のプロモーターの転写活性に影響を与える薬剤がこれら疾患の発症や抑制に作用する可能性があることを示唆する。従って、本発明のプロモーターは、これら疾患に関連する薬剤のスクリーニングに利用できる可能性が考えられる。

#### 【0030】

また、MEGSIN発現量がIgA腎症患者や糖尿病性腎症患者において亢進していることから、腎疾患の発症に関与していると考えられる。よって本発明のプロモーターの活性を制御する薬剤を該患者に投与することにより、IgA腎症や糖尿病性腎症の発症や進展を抑制することも可能であると考えられる。

#### 【0031】

また、本発明は、本発明のプロモーターに結合するタンパク質のスクリーニング方法に関する。本発明のプロモーターに結合するタンパク質としては、例えば、転写因子を挙げることができる。「転写因子」とは、本発明のプロモーターに結合して、該プロモーターの下流の遺伝子の発現を正または負に調節するタンパク質を指す。

#### 【0032】

本発明のスクリーニング方法は、（a）被検試料を配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその一部に接触させる工程、および（b）配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその一部と結合するタンパク質を選択する工程、を含む。

#### 【0033】

本発明のスクリーニングは、当業者に公知の方法（「新細胞工学実験プロトコール（秀潤社）」、「バイオマニュアルシリーズ5転写因子研究法（羊土社）」、「DNA & Cell Biology, 13, 731-742 (1994)」参照）、例えば、アフィニティーカラムを用いた方法、サウスウエスタン法、フットプリントイング法、ゲルシフト法、one-hybrid法などをにより行うことができる。

#### 【0034】

アフィニティーカラム法を用いる場合は、前述の方法で得た、本発明のプロモ

ーターをセファロース或いはラテックスビーズに固定化したカラムに、核抽出液をかけ、カラムを洗浄後、カラムに固定化した配列と同様の配列を有するDNAを用い、結合した転写因子を溶出する。

【0035】

また、サウスウェスタン法を用いる場合は、例えば本発明のプロモーターに結合する転写因子が発現していると予想される細胞（例えばメサンギウム細胞など）由来のmRNAからcDNAを調製する。その後、大腸菌の発現ベクター、例えば $\lambda$ gt11に該cDNAを組み込んだcDNAライブラリーを作製し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を合成させ、ニトロセルロース膜に該融合蛋白質を吸着させて、放射性同位元素で標識された本発明のプロモーターをプローブにし、結合活性をもつ融合蛋白質を合成するファージを選択する。

【0036】

フットプリント法を用いる場合は、放射性同位元素で標識したプロモーターをプローブとし、これを細胞核抽出液と反応後、DNase Iで消化し、電気泳動することによってタンパク質結合DNA配列を決定することができる。

【0037】

ゲルシフト法を用いる場合は、まずプロモーター領域内の任意の配列からプローブを作製し、放射性同位元素で標識する。次に、この標識プローブと細胞核抽出液を反応させ、電気泳動を行い、プローブに結合する核タンパク質の有無を確認することができる。

【0038】

one-hybrid法を用いる場合は、例えば、まず、MEGSINプロモーター配列を少なくとも3コピー、タンデムに並べた配列をレポーター遺伝子の上流に挿入し、酵母ゲノム内に組むことにより、レポーター株を作成する。次に、上記のcDNAとGAL4（酵母のDNA結合性転写活性化因子）の活性化ドメイン（GAL4 AD）のコード領域とを連結させ、これらの融合タンパク質をコードするような活性化ドメイン（AD）ライブラリーを作製し、これを前述のレポーター株に導入する。ADとDNA結合タンパク質とのハイブリッドタンパク質がMEGSINプロモーター配列へ結合することにより、転写が活性化されて、その効果を、レポーター遺伝子の発現を通じ

て検出することができる。

【0039】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。

【0040】

【実施例1】ヒトメサンギウム細胞の初代培養

ヒトメサンギウム細胞 (Clontech社) は、10%ウシ胎児血清 (GIBCO社)、100 IU/mLのペニシリン、100 μg/mLのストレプトマイシンおよび200 μg/mLのL-グルタミンを含有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。

【0041】

【実施例2】ヒトMEGSIN遺伝子の転写制御領域の単離

ヒトMEGSIN遺伝子の上流領域は、Genome Walker Kits (Clontech社) を用いて単離した。即ち、Genome Walker Kitsのヒトゲノムライブラリーを鋳型として、MEGSINのcDNA配列 [Miyata,T. et al., J.Clin.Invest., 120, 828-836 (1998)] からデザインされたMEGSIN特異的プライマー (5'-CGTCGACGGACACGTCTACGTCCG ACG-3' / 配列番号: 4) およびキットに添付されているアダプタープライマーとPCRバッファーを用いたネスティドポリメラーゼ連鎖反応 (nested Polymerase Chain Reaction) により、ヒトMEGSIN遺伝子の上流領域を増幅した。また、同様にしてエキソン-イントロン境界領域のゲノムDNAも単離した。

【0042】

さらに、TFSEARCHプログラム (Yutaka Akiyama: 京都大学) を用いたTFMATRIX 転写因子結合部位データベース (E.Wingender, R.Knueppel, P.DietzeおよびH.Karas: GBF-Braunschweig) の解析により、高度に保存されている転写因子結合部位配列を検索した。

【0043】

ゲノムDNA配列の解析の結果、ヒトMEGSIN遺伝子は8つのエキソンと7つのイントロンを有し、約20kbにわたってコードされていることが判明した。また、エキソン-イントロン境界部位 (スプライス部位) は、GT-AG則に従っていた。そ

の構造を表1に示す。表の配列中、大文字はエキソン、小文字はイントロンを表す。

## 【0044】

【表1】

No.	エキソン (bp)	イントロン (kbp)	ドナー配列	アクセプター配列
1	346	6.0	CTAGCgtgag	tctagGCTGC
2	186	0.5	ATAAGgtcag	tacagTTGCT
3	51	0.9	GTCAGgtaaa	aacagTCAGG
4	117	3.3	ATAAGgtaaag	tatagGACTA
5	118	3.0	ACATGgtgag	aaaagGCAAA
6	143	3.0	CCAAGgtatg	ttcagTGCTC
7	147	3.5	CTGAAgtaaag	tacagATTGA
8	1141			

## 【0045】

ヒトMEGSIN遺伝子のエキソン-イントロン境界領域の塩基配列と、MEGSINと同じSerpinスーパーファミリーに属するプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター type2 (PAI-2) [Ye, R.D., J.Biol.Chem., 264, 5495-5502 (1989)] 遺伝子のそれとの比較を図1に示す。両者の配列は高度に保存されており、系統的に近い関係にあることが判明した。

## 【0046】

決定したヒトMEGSIN遺伝子のプロモーター領域 (-1431~-1) の塩基配列を図2および配列番号：2に、5' 非翻訳領域 (5'-UTR) (1~181) の塩基配列を図2および配列番号：3に示す。

## 【0047】

【実施例3】 蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH)

フィトヘマグルチニン (PHA) で刺激したヒト末梢血培養リンパ球から分裂中

期群の染色体標本スライドを常法により作製した。FISH用のプローブは、F581クローン由来のDNAをニックトランスレーション法によりジゴキシゲニン-dUTPで標識したものを使用した。前記スライド標本に、標識化プローブを50%のホルムアミド、10%のデキストラン硫酸および2×SSCを含むバッファーと混合し、ハイブリダイズした。ハイブリダイズされたスライド標本をフルオレセイン標識抗ジゴキシゲニン抗体 (Boehringer Mannheim社) とともにインキュベーションし、4', 6'-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) を用いた対比染色を行うことにより特異的なハイブリダイゼーションシグナルを検出した。二色染色によるプローブの検出は、標本スライドをフルオレセイン標識抗ジゴキシゲニン抗体 (Boehringer Mannheim社) およびテキサスレッド標識アビジン (Boehringer Mannheim社) とともにインキュベートし、DAPIを用いた対比染色により行った。その結果、ヒトMEGSIN遺伝子は、染色体18q21.3に存在していた。

#### 【0048】

[実施例4] S1ヌクレアーゼプロテクションアッセイによる転写開始点の同定  
MEGSIN mRNAの5'末端は、実施例1で調製したヒトメサンギウム細胞から抽出したpoly(A)<sup>+</sup> RNAを用いて、S1ヌクレアーゼプロテクションアッセイ法 [Berk, A.J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 75, 1979 (1978)] により決定した。

#### 【0049】

まず、マルチプライム法により、標識DNAプローブを調製した。即ち、開始点の前後を充分にカバーするような、bp +161～+191に対応するオリゴヌクレオチドプライマー (5'-ttccctgtac atgcacttag gaaggtgatg a-3' /配列番号：5) を変性したMEGSINプロモーターにアニールさせた。次にプライマーを [<sup>32</sup>P]-dCTPを含有するバッファー中でクレノウ酵素とともに37℃で15分間インキュベートした後、反応生成物をSephadex G-50カラム (Pharmacia製) を用いて精製し、アイソトープ標識プローブとして使用した。次にS1-Assay kit (Ambion社) を用い、標識プローブを55℃16時間の条件で、培養メサンギウム細胞から調製した0.2μgのmRNAとハイブリダイズさせた。DNA-RNAハイブリッドにS1ヌクレアーゼを含有する500μgのS1バッファーを加え、37℃で30分間インキュベーションした。最終生成物を電気泳動し、オートラジオグラフィーにより分析した(図3)。

## 【0050】

その結果、ヒトMEGSIN遺伝子の第1エキソンは346bpであることが判明した。しかしながら、他にも3つの転写開始点が存在することが明らかとなった。さらに、ヒトメサンギウム細胞の全RNAを試料とし、5'-RACEキット（宝酒造製）を用い、製品に添付の説明書に従い操作し、転写開始点を決定した（図2）。

## 【0051】

塩基配列の解析の結果、AP-1結合部位、cMyb結合部位、およびOct-1を含む、転写制御部位となり得る保存されたプロモーター配列がMEGSIN遺伝子の上流領域に見出された。また、TATAボックス [Mol.Cell.Biol., 1, 281 (1981)] やCAATボックス [Science, 236, 1237 (1987)] のコンセンサス配列は見出されなかつた。

## 【0052】

## [実施例5] MEGSIN転写制御領域の機能検定

転写制御領域の検定のため、MEGSIN遺伝子の上流領域 (KpnI-DraI断片； -1154～+59) またはその欠失変異DNAとルシフェラーゼ遺伝子を連結させたベクターを作製した。さまざまな欠失変異DNAは、アッセイに用いる領域を覆うようなプライマー対を設計し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により調製した。具体的には、アンチセンスプライマーとしてプライマー-13 (5'-aggctgtccaaagggtgcagcctgcactctg-3' /配列番号：18) を用い、センスプライマーとしてプライマー-1 (5'-ggtaaccttctaattccaaatgcctttac-3' /配列番号：6) 、プライマー-2 (5'-ccagttacttggataaatgttggctgtact-3' /配列番号：7) 、プライマー-3 (5'-ctcaggcagaaggaccaggcttgcagtcat-3' /配列番号：8) 、プライマー-4 (5'-acatacagctcaacactcatgtgctacggc-3' /配列番号：9) 、プライマー-5 (5'-cctcatgtatgctacggccagaaactgaaat-3' /配列番号：10) 、プライマー-6 (5'-ccaagttcagctcctatctgaagctgtctc-3' /配列番号：11) 、プライマー-7 (5'-ggtccagatgaaaatctgagattggagaat-3' /配列番号：12) 、プライマー-8 (5'-atgtcttgaccaggctgacagatactgtt-3' /配列番号：13) 、プライマー-9 (5'-cctcctgaaatctgattcacatacaaactg-3' /配列番号：14) 、プライマー-10 (5'-aatgaactacataacaaccacccatgtcag-3' /配列番号：15) 、プライマー-11 (5'-tacataacaaccacccatgtcagatactac-3' /配列番号：

16)、またはプライマー12 (5'-tactactttgaaacctggttcaaaacctaa-3' /配列番号: 17) を用い、それぞれMEGSIN遺伝子の-1079～+59、-1040～+59、-1000～+59、-940～+59、-927～+59、-669～+59、-497～+59、-258～+59、-158～+59、-128～+59、-121～+59または-97～+59を含む欠失変異DNAを作製した。ルシフェラーゼ発現ベクター (Picca Gene Basic Vector 2: 東洋インキ製) (図4)のマルチクローニング部位をKpnIおよびHindIIIで切断し、上記のPCR産物をライゲーションさせて、ベクターへ組み込んだ。ベクターは、 LiopfectAmine (Gibco-BRL社) を用いて、添付の説明書に従い細胞へ導入した。

#### 【0053】

まず、欠失させないMEGSIN遺伝子の上流領域 (-1154～+59) を使ったベクターを種々の細胞へ導入し、転写活性の細胞種による特異性を検討した (図5)。ベクターを37°C 5時間の条件でトランスフェクションした (Derijard, B. et al., Cell, 76, 1025-1037 (1994))。37°Cで2日間培養した後、培養液を取り除き、細胞をPBSで3回洗浄し、細胞溶解 (cell lysis) バッファーで溶解させライセートを得た。細胞のライセートは遠心し細胞残渣を沈殿させて除いた。蛍光の発光量は、Lumat LB9507ルミノメーター (EG&G Berthold社) を用いて直接測定した。出力光の測定値を、波長570nmにおける吸光度により算出したそれぞれのβ-ガラクトシダーゼ活性 [Herbomel, P. et al., Cell, 39, 653-662 (1984)] で割ることにより、相対ルシフェラーゼ活性を求めた。

#### 【0054】

細胞としては、実施例1に記載の培養ヒトメサンギウム細胞 (Clontech社)、ヒト真皮線維芽細胞 (HDF: 宝酒造)、およびヒト腎皮質上皮細胞 (HRCE: 宝酒造) を使用した。その結果、ルシフェラーゼ活性は、培養ヒトメサンギウム細胞において特異的に観察された (図5)。このことから、用いた転写制御領域はメサンギウム細胞に対し特異性を有することが判明した。

#### 【0055】

次にさまざまな欠失変異DNAについても前記と同様に操作して、ベクターへ組み込み、ヒト類表皮癌細胞株A431または実施例1の培養ヒトメサンギウム細胞 (Clontech社) にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。その

結果を図6に示す。グラフは、欠失させないMEGSIN遺伝子の上流領域における活性を100%とした相対値で示した。

#### 【0056】

-1154bpから-941bpまでを欠失させると、転写活性は約60%に減少したことから、この領域に転写を正に制御する配列が存在することが示された。さらに-159bpまで欠失させても、転写活性はほとんど低下しなかった。しかし、-158bpから-121bpまでを欠失させると、転写活性は全長の場合にくらべ5%に減少した。特に、-128bpから-121bpまでの間に転写活性が急激に低下することから、-128～-121の領域が転写を正に制御するのに重要であると考えられる。

#### 【0057】

また、-129～-90領域は、転写制御因子であるAP-1 (activating protein 1) 結合配列 (cttagtcaga) [Lee,W. et al., *Nature*, 325, 368-372 (1987)、Follett,V.C. et al., *J.Leuk.Biol.*, 63, 139-152 (1998)]、c-Myb結合配列 (aaca accacc) (配列番号：1の13～22位) およびOct-1結合配列 (ctacataacaac) (配列番号：1の7～19位) [Rosenfeld,M.G. et al., *Genes Dev.*, 5, 897-907 (1991)] を有することから、この領域に転写制御部位が存在する可能性が示唆された。

#### 【0058】

これらの領域がMEGSIN遺伝子の転写活性化に関与しているかどうかをさらに検証するために、これらの領域のさまざまな部位に変異を導入し、転写活性を及ぼす影響を調べた。即ち、特定塩基に変異を導入することによる転写調節ドメインのポテンシャルの変化を調べるために、Quick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene製) を用い、説明書に従い操作し、-128～-127をggに (m1) 、-120～-117をccccに (m2) 、-116～-115をggに (m3) 、-113～-112をggに (m4) 、-106～-105をggに (m5) 、-100～-98をggcに (m6) 、-94～-93をggに (m7) に変異させた種々の変異体を作製した。

#### 【0059】

これらの変異体の生成は、直接ダイデオキシ核酸シークエンス法により確認した。これらの変異体を前述と同様に、ベクターに組み込み、そのルシフェラーゼ

活性を求めた。その結果、m3～m7の変異体において、ルシフェラーゼ活性は著しく低下した（図7）。図中のグラフは、欠失させないMEGSIN遺伝子の上流領域における活性を100%とした相対値で示した。

#### 【0060】

##### 【実施例4】 プロモーター結合タンパク質の検索

実施例3により、-128から下流（3'側）の領域が転写を正に制御する活性を有することが判明したため、この領域に結合するタンパク質（転写因子）を2種類のプローブ[プローブA（5'-GAATGAACATACATAACAAACCACC-3'／配列番号：19；-129～-107領域）およびプローブB（5'-AACCACCTTAGTCAGATACTACTTT-3'／配列番号：20；-113～-89領域）]を用いたゲルシフトアッセイにより検定した。

#### 【0061】

まず、各プローブの末端を常法によりラベル化した。次に、実施例1のメサンギウム細胞から核抽出物をDignamらの方法[Dignam, J. et al., Nucleic Acid Res., 11, 1475-1489 (1983)]により調製した。続いて、10%グリセロール、5mMの塩化マグネシウム、1mMのEDTA、25mMのジチオスレイトール、50mMの塩化カリウム、10mMのHepes-KOH、3μgのpoly (dI-dC)、7μLの核抽出物、およびラベル化プローブを含む反応液中、室温で30分間の条件でDNA-蛋白結合反応を行った。反応後、電気泳動に供し、オートラジオグラフィーで解析した。その結果、いずれのプローブにおいてもDNA-蛋白複合体のバンドシフトが認められたことから、2種類の転写因子の存在が確認できた（図8）。

#### 【0062】

MEGSINのメサンギウム細胞特異的発現がこの領域を認識する転写因子の量的影响に左右されるかどうかを検討するために、実施例1に記載の培養ヒトメサンギウム細胞（Clontech社）、ヒト平滑筋細胞（HSMC：宝酒造）、ヒト真皮線維芽細胞（HDF：宝酒造）およびヒト腎皮質上皮細胞（HRCE：宝酒造）を用いてゲルシフトアッセイを行い、比較した。DNA-蛋白錯体の量は、いずれのプローブにおいても培養ヒトメサンギウム細胞で特異的に多かった（図9）。このことは、MEGSINのメサンギウム細胞特異的発現がこの領域を認識する転写因子により影響を受けることを示している。

【0063】

## 【発明の効果】

本発明により、メサンギウム細胞に特異的に発現しているMEGSIN遺伝子のプロモーターが提供された。本発明のプロモーターは、メサンギウム細胞特異的な遺伝子発現のためのプロモーターとして利用することができ、例えば、種々の腎疾患の遺伝子治療への応用が考えられる。また、該プロモーターに結合する転写因子などのタンパク質のスクリーニングに利用することも可能である。

【0064】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; MIYATA, Toshio

KUROKAWA, Kiyoshi

&lt;120&gt; MEGSIN Promoter

&lt;130&gt; F2-003

&lt;160&gt; 20

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

aatgaactac ataaacaacca ccttagtcag atactacttt gaaacctggc tcaaaaccta 60

aatgcttata agarrcttga gagacagtgc tgtgctctga gtcataggga agccatccca 120

gaagccag

128

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1431

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

actttatatc ctcagtaggt aagaaataca aaggatatgg gattcaaaat attcagccct 60  
 tgaacactgc aattagaata tggagaacag ggaatccatt tgtaggctca ttttttttt 120  
 atattaacaa caaccttctc cttcagaaag ttcaccacaa ctgctaaatc aaaattaaat 180  
 ttcagggatt ttctgcaact ttactttct ctatgattat tcatctcata aacaatcatg 240  
 gaggtgagca ataactactt tattcgattt tggataagtt aacaggaccc ctttcttcct 300  
 gggaggagg caaaattgca caaaattgag aggcgagcaa ctgtaagatg atggtacctt 360  
 ctaattccaa tagctttta caatagagaa cccagttact tggataaaatg ttggcigtac 420  
 tttgaaaac actcaggcag aaggaccagg ctgcagtca ttccatgca tagcaggtga 480  
 aggttaggtgc aacatacagc tcaaccctat gatgctacgg ccagaaactg aaatgtgtt 540  
 ttgccccgt gtggcatgtt ctgatggcaa aggtgttaggc aaccaactag gccaaccta 600  
 ctttcccta cacctggtca ctttcaaag tgcaaaccctt cttaacaaa ctctagccctg 660  
 tattatagga ggaaggatct gggtggtgca gacgtggctt tccattgcca gatcagaagg 720  
 gtggaggaga gactggcagg atgacaagaa tgaatgaaca caccaagttt cagctccat 780  
 ctgaagctgc tcagttcagg taagcattta gagaagccag ttgcataac taacaggc 840  
 aatgtttctc tggaaaattc caagccagag aaaattgaga aaaagaggaa aggatggaaa 900  
 gcagtacaaa gagaagccag ctcaaaaggt tagaggtcca gatgaaaatc tgagattgga 960  
 gaatgataaa aaacattgtg tgagattcta ttttaggtca ttatgctagg gaaatttaca 1020  
 caggataggg ttgaaagaaa ttaggctata agatgagtgg caagttgcaa taaaatggca 1080  
 ccctaaactc accaagtac tttgtcact gctatctgc ctttagttat ttgatgtcta 1140  
 gttagtcata ttgtgtgtt ctcacagaag agtatgtctt gacccaggct gacagatact 1200  
 gttgattctg aaatttgttt ttatggttat gttaaaacca ttgtcattat aagaaacaga 1260

gatgggaata ttgcctcctg aaatctgatt cacatacaaa ctgaatgaac tacataacaa 1320  
 ccacacctgt cagatactac tttgaaacct gttcaaaac ctaaatgctt ataagarrct 1380  
 tgagagacag tgctgtgctc tgagtcata ggaagccatc ccagaagcca g 1431

<210> 3

<211> 181

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1)..(181)

<400> 3

gtctacttat caataagcag ctgcctgtgc agagtgcagg ctgcaccttt ggacagccctt 60  
 taaaactgaa ttctcagaat tttagaacaa attttgtct agaaatgctg actttggttc 120  
 attaggttgtt ggtaaaacag gctcccttcg aagctctcct tcatcacctt cctaagtgca 180  
 t 181

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
 artificially synthesized primer sequence.

<400> 4

cgtcgacgga cacgtctcac gtccgacg

28

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

&lt;400&gt; 5

ttccctgtac atgcacttag gaagggtatg a

31

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

&lt;400&gt; 6

ggtacccttct aattccaata gctttttac

29

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 7

ccagttactt ggataaatgt tggctgtact

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 8

ctcaggcaga aggaccaggc ttgcagtcat

30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 9

acatacagct caacctcatg atgctacggc

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 10

cctcatgatg ctacggccag aaactgaaat

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 11

ccaagtttca gtccttatct gaagctgctc

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 12

ggtccagatg aaaatctgag attggagaat

30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 13

atgtcttgac ccaggctgac agatactgtt

30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 14

cctcctgaaa tctgattcac atacaaactg

30

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 15

aatgaactac ataacaacca ccttagtcag

30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 16

tacataacaa ccaccttagt cagatactac

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 17

tactactttg aaacctggtt caaaacctaa

30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 18

aggctgtcca aaggtgcagc ctgcactctg

30

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence.

&lt;400&gt; 19

gaatgaacta cataacaacc acc

23

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence.

&lt;400&gt; 20

aaccaccta gtcagatact acttt

25

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

ヒトMEGSIN遺伝子とPAI-2遺伝子の、エキソン-イントロン境界領域の比較を示す図である。大文字はエキソン、小文字はイントロンを表す。

## 【図2】

ヒトMEGSIN遺伝子の第1エキソン(5'-UTR)およびその上流1431bpの配列を示す図である。5'-RACEにより得られたクローンの5'端を「\*」で示した。

## 【図3】

ヒトMEGSIN遺伝子の転写開始部位を決定するためのS1ヌクレアーゼアッセイの結果を表す図である。

## 【図4】

ルシフェラーゼアッセイに用いられたベクターの構造を示した図である。

## 【図5】

種々の細胞を用いて、ヒトMEGSIN遺伝子転写制御領域によるルシフェラーゼアッセイを行った結果を表す図である。  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性で標準化したプロモーターの相対活性を示す。

## 【図6】

欠失させたヒトMEGSIN遺伝子転写制御領域によるルシフェラーゼアッセイの結果を表す図である。  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性で標準化したプロモーターの相対活性(欠失させていない場合を100とした値)を示す。(A)はヒト類表皮癌細胞株A431における結果を、(B)はヒトメサンギウム細胞における結果を示す。

## 【図7】

部位特異的変異を導入したヒトMEGSIN遺伝子転写制御領域によるルシフェラーゼアッセイの結果を表す図である。下段は導入した変異を、上段は  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性で標準化したプロモーターの相対活性(欠失させていない場合を100とした値)を示す。また、下段にOct-1、c-Myb、およびAP-1の結合部位も示した。

## 【図8】

ヒトMEGSIN遺伝子転写制御領域(-129~-89)を用いたゲルシフトアッセイの結果を示す図である。上段に用いたプローブDNA配列、下段にその結果を示す。

## 【図9】

種々のヒトプライマリー細胞抽出物を用いた、ヒトMEGSIN遺伝子転写制御領域(-129~-89)のDNAのゲルシフトアッセイの結果を示す図である。図8に示したプローブAおよびプローブBを用いた。

【書類名】 図面

【図1】

エキソン II

megsin	ATTGATAAGgtcag	tacagTTGCTTCAT
PAI2	ATGGCCAAGgtgag	tgcagGTGCTTCAG

エキソン III

megsin	AATAGTCAGgtaaa	aacagTCAGGGCTC
PAI2	ATTTTGCAGgtatc	tcaagGCACAAGCT

エキソン IV

megsin	TTTCATAAGgtaaag	tatagGACTACATT
PAI2	TTCCGGGAAgtaag	aaaagGAATATATT

エキソン V

megsin	ACATGgtgag	aaaagGCAAA
PAI2	CAAACCAAAGgtaaa	ctgtagGCAAAATCC

エキソン IV

megsin	CCAAGgtatg	ttcagTGCTC
PAI2	GTAAACTCGgtatg	attagGCTCAGCGC

エキソン IV

megsin	CTGAAgtaag	tacagATTGA
PAI2	TTGGAGCTGgtaaag	tgcagCTGGAAAGT

## 【図2】

## ・プロモーター領域 1431bp (-1431~-1)

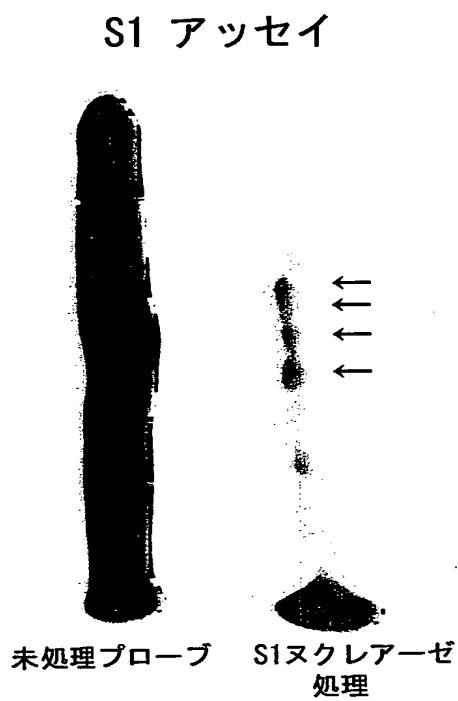
-1431

a ctttatatcc tcagtaggta agaaatacaa aggatatggg attcaaaata -1381  
 ttcagcctat gaacactgca attagaatat ggagaacagg gaatccattt gtaggctcat -1321  
 tttttttta tattaacaac aacttctcc ttcagaaagt tcaccacaac tgctaaatca -1261  
 aaattaaatt tcagggattt tctgcaactt tactttctc tatgattatt catctataa -1201  
 acaatcatgg aggtgagcaa taactacttt attcgatttt ggataagttt acaggacccc -1141  
 cttcttcctg ggaaggaggc aaaattgcac aaaattgaga ggcgagcaac tgtaagatga -1081  
 tggtacccctc taattccaaat agcttttac aatagagaac ccagttactt ggataaatgt -1021  
 tggctgtact ttgaaaaca ctcaggcaga aggaccaggc ttgcagtcatttccatgcat -961  
 agcagggtgaa ggttaggtgca acatacagct caacctcatg atgctacggc cagaaactga -901  
 aatgtgtttt tgccctgtg tggcatgttc tgatggcaaa ggtgtaggca accaactagg -841  
 cccaaacctac cttccctac acctggtcac ttttcaaagt gcaaaccac ttaacaaac -781  
 tctagcctgt attataggag gaaggatctg ggtggcag acgtggctt ccattgccag -721  
 atcagaaggg tggaggagag actggcagga tgacaagaat gaatgaacac accaagttc -661  
 agctcctatc tgaagctgct cagttcaggta aagcatttag agaagccagt tgcaataact -601  
 aacaggcCAA atgtttctct ggaaaatttcc aagccagaga aaattgagaa aaagagggaa -541  
 ggtggaaag cagtacaaag agaagccagc tcaaagggtt agaggtccag ataaaaatct -481  
 gagattggag aatgataaaa aacattgtgt gagattctat tttaggtcat tatgttaggg -421  
 aaatttacac aggatagggt tggaaagaaat taggctataa gatgagtggc aagttgcaat -361  
 aaaatggcac cctaaactca ccaagtcaact gttgtcaactg ctatcttgcc tttagttgatt -301  
 tgatgtctag ttgtcttatt tggatgttc tcacagaaga gtatgtctt acccaggctg -241  
 acagatactg ttgattctga aatttggat tttttttt tttttttt taaaaccat tgtcattata -181  
 agaaacagag atggaaatat tgcctcctga aatctgattt acatacaaac tgaatgaact -121  
 acataacaac caccttagtc agatactact ttgaaacctg gttcaaaacc taaatgctta -61  
 taagarrctt gagagacagt gctgtgctct gagtcatagg gaagccatcc cagaagccag -1

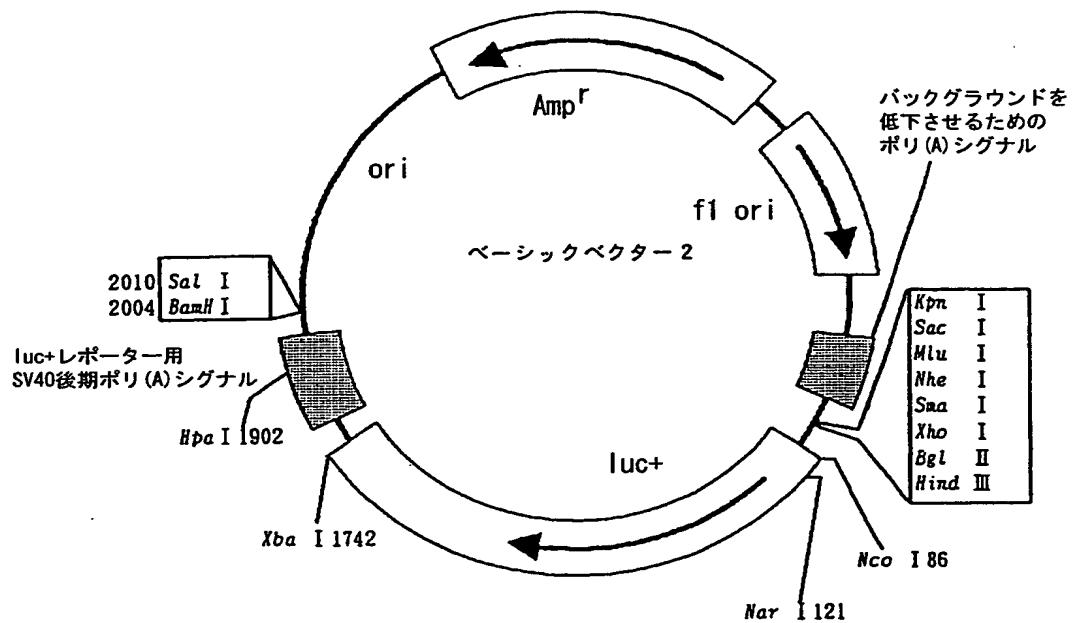
## ・5' - 非翻訳領域 (5' -UTR) 181bp (+1~-+181)

gtctacttat caataaggcag ctgcctgtgc agagtgcagg ctgcacctt ggacagccctt 60  
 taaaactgaa ttctcagaat tttagaaacaa attttttgtct agaaatgctg actttggttc 120  
 attaggttagt ggtaaaacag gtccttcg aagctctcct tcattcacctt cctaaatgtca 180  
 t 181

【図3】

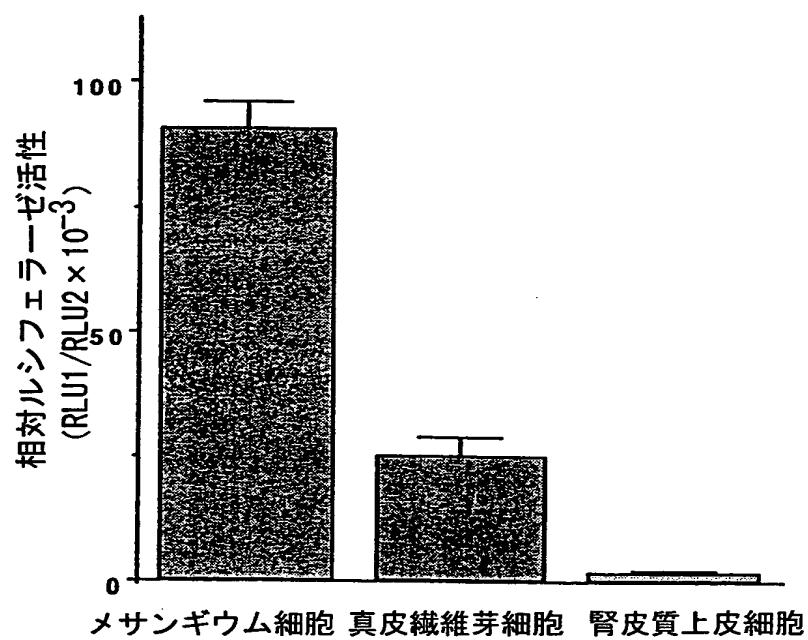


【図4】



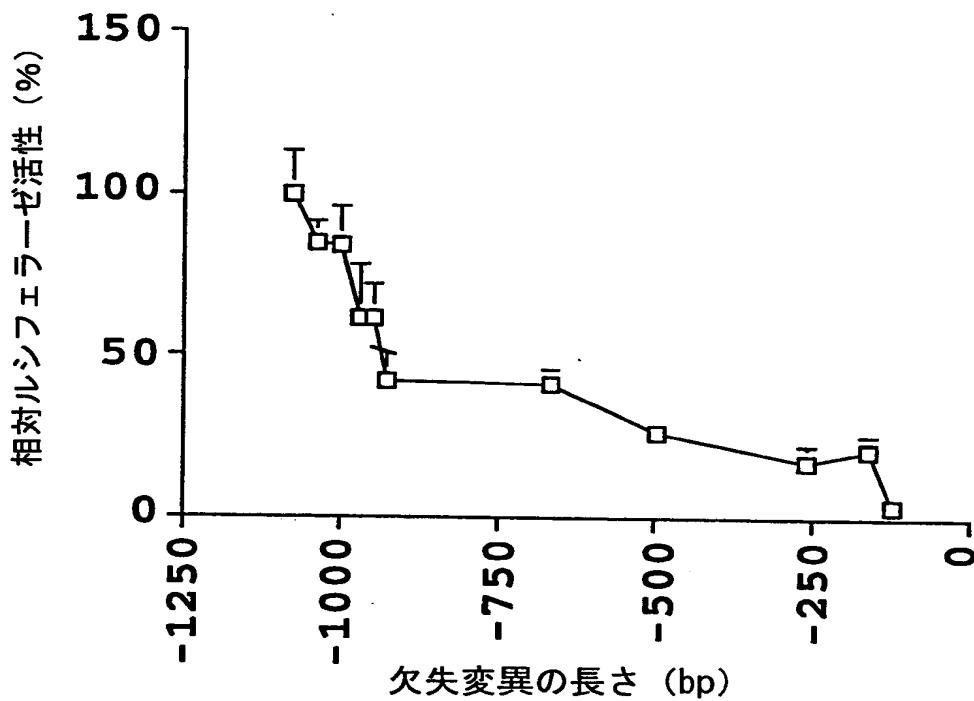
プロモーター	(なし)
エンハンサー	(なし)
SV40 後期ポリ(A)シグナル	1772-1993
ルシフェラーゼ遺伝子(luc+)	88-1737
上流のポリ(A)シグナル	4658-4811
マルチブルクローニング部位	1-58
$\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子(Amp <sup>r</sup> )	3940-3083
f1複製開始点	4073-4527
ColE1-由來のプラスミド複製開始点	2313

【図5】

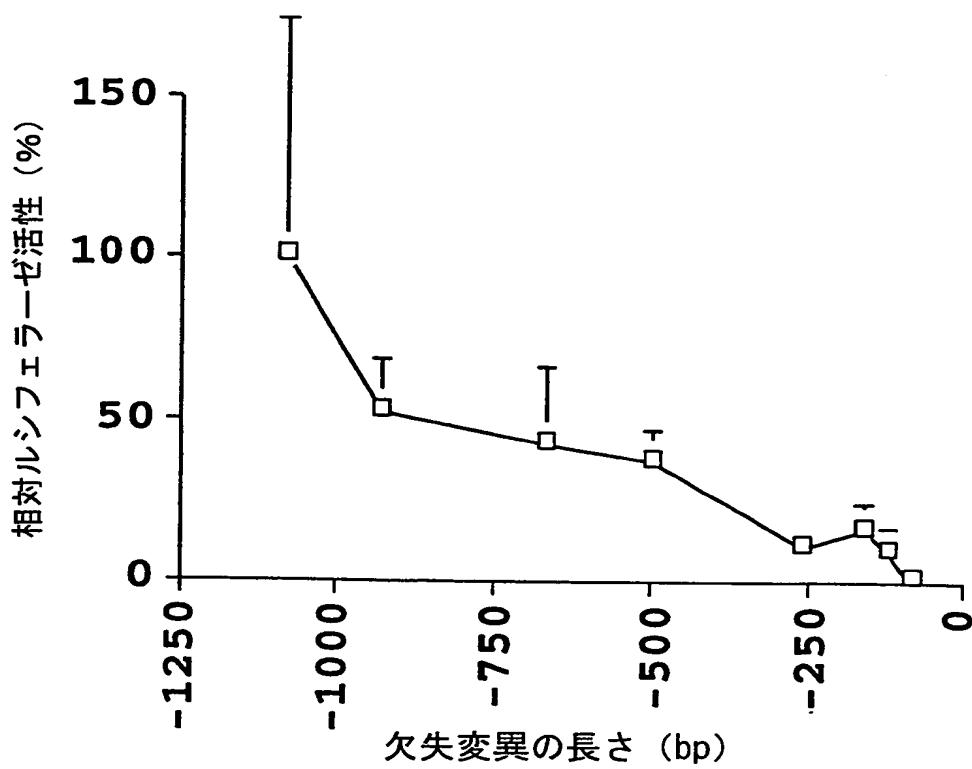


【図6】

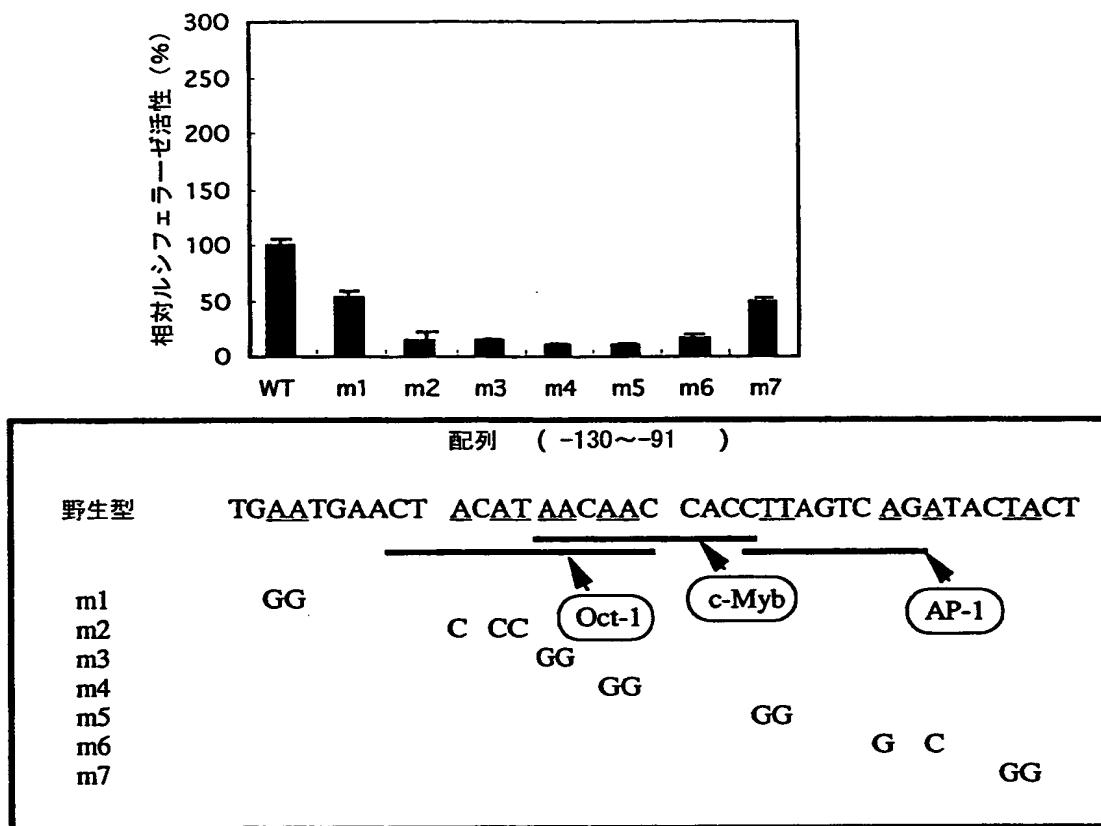
## (A) A431細胞



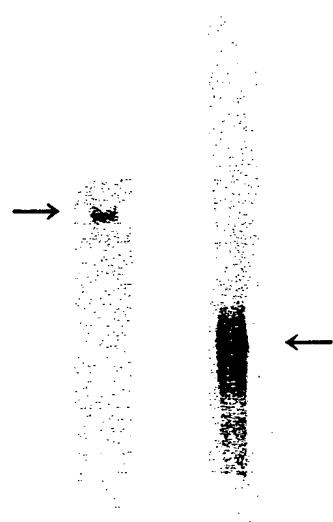
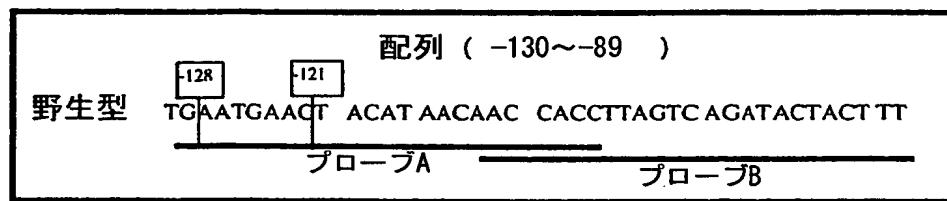
## (B) ヒトメサンギウム細胞



【図7】

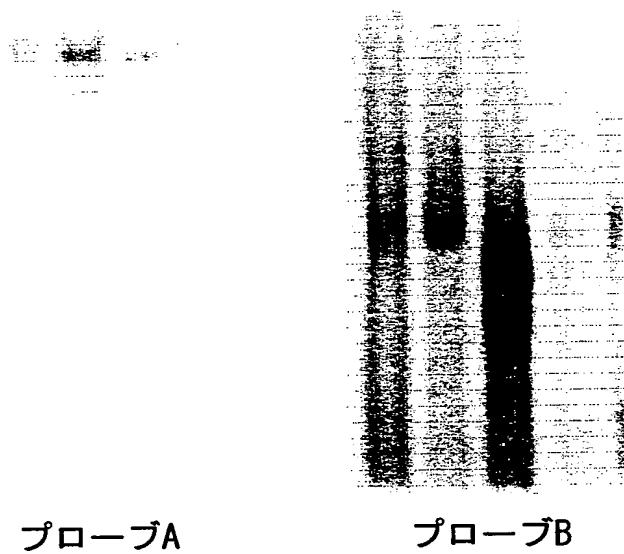


【図8】



【図9】

ヒト平滑筋細胞 (HSMC)  
ヒト真皮織芽細胞 (HDF)  
ヒトメサンギュム細胞 (HMC)  
ヒト脣皮質上皮細胞 (HRCE)  
ヒト平滑筋細胞 (HSMC)  
ヒト真皮織芽細胞 (HDF)  
ヒトメサンギュム細胞 (HMC)  
ヒト脣皮質上皮細胞 (HRCE)



プローブA

プローブB

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 MEGSIN遺伝子のプロモーターを提供することを課題とする。

【解決手段】 MEGSIN遺伝子の上流約 1.5kbを含むゲノムDNA領域を単離し、その塩基配列を決定した。また、該ゲノムDNA領域において、転写を正に制御する2つの制御配列を同定した。さらに、これら2つの制御配列のうち3'側に位置するプロモーター領域について、部位特異的変異導入法により塩基置換を行い、そのプロモーター活性に重要な役割を担う塩基配列を特定することに成功した。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [597142376]

1. 変更年月日 1997年 9月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県小田原市城山3-3-1

氏 名 宮田 敏男

2. 変更年月日 1999年 2月10日

[変更理由] 住所変更

住 所 神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101

氏 名 宮田 敏男

出願人履歴情報

識別番号 [597142387]

1. 変更年月日 1997年 9月22日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401  
氏名 黒川 清